

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-504561

(43) 公表日 平成8年(1996)5月21日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	P I
C 1 2 P 21/02	C	9282-4B	
C 0 7 K 14/79		8318-4H	
C 1 2 N 1/19		8628-4B	
		9281-4B	C 1 2 N 15/00
		7729-4B	5/00
			A
			A
	審査請求 有	予備審査請求 有	(全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-519314	(71) 出願人	ベイラー・カレッジ・オブ・メディシン アメリカ合衆国77030テキサス、ヒュース トン、ワン・ベイラー・プラザ (番地の表 示なし)
(86) (22) 出願日	平成5年(1993)4月16日	(72) 発明者	コニーリー、オーラ・エム アメリカ合衆国77025テキサス、ヒュース トン、ナンバー1307、サウス・ブレイスウ ッド2601番
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)10月24日	(72) 発明者	ヘドン、デニス・アール アイルランド、ゴールウェイ、ダンガン・ ローワー、アグナクラ、リシン (番地の表 示なし)
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 3 / 0 3 6 1 4	(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)
(87) 国際公開番号	W O 9 3 / 2 2 3 4 8		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成5年(1993)11月11日		
(31) 優先権主張番号	0 7 / 8 7 3 , 3 0 4		
(32) 優先日	1992年4月24日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

(54) 【発明の名称】 組織えヒトラクトフェリンの製造

(57) 【要約】

本発明は、新規プラスミド、トランスフェクションした真核細胞、およびこれらプラスミドおよびトランスフェクションした真核細胞の製造方法を提供する。該新規プラスミドは、ヒトラクトフェリンタンパク質をコードするcDNAを含有する。アスベルギルス・オリゼーにおけるヒトラクトフェリンタンパク質の製造方法も提供される。それゆえ、本発明は、組織えヒトラクトフェリンの効率的かつ経済的な製造方法を提供する。

【特許請求の範囲】

1. 選択マーカー遺伝子を含む配列、プロモーターを含む配列、転写停止配列、およびリンカー配列を連結し、該配列をクローニングしてプラスミドを生成させ、該プラスミドを制限エンドヌクレアーゼで消化し、ラクトフェリンをコードするcDNAを制限部位に挿入し、ついでラクトフェリンcDNAを発現する該プラスミドで真核細胞を形質転換することの特徴とする、生物学的に活性な組換えラクトフェリンの製造方法。
2. 該選択マーカー遺伝子がpyr4、pyrG、andS、argBおよびtrpCよりなる群から選ばれたものである請求項1に記載の方法。
3. 該細胞がラクトフェリンを発現する請求項1に記載の方法。
4. 請求項2に記載の方法により製造されたラクトフェリン。
5. 該プロモーターがアルコールデヒドロゲナーゼ、argB、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよびbenAよりなる群から選ばれたものである請求項1に記載の方法。
6. 該転写停止配列が、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼおよびbenAよりなる群から選ばれたものである請求項1に記載の方法。
7. 該リンカー配列が α -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよびラクトフェリンよりなる群から選ばれたものである請求項1に記載の方法。
8. 図6記載のcDNAおよび真核細胞中で該cDNAを発現させるのに必要な制御要素からなる、真核細胞中での発現に適合されたプラスミド。
9. pAHLFGであるプラスミド。
10. 請求項8に記載のプラスミドを含む真核細胞。
11. 該真核細胞が真菌細胞および昆虫細胞よりなる群から選ばれたものである請求項10に記載の真核細胞。
12. 該昆虫細胞がSF9である請求項11に記載の真核細胞。
13. 該真菌細胞が酵母である請求項11に記載の真核細胞。
14. 該酵母細胞がアスペルギルスである請求項13に記載の真核細胞。

15、該アスペルギルス株がアスペルギルス・オリゼー、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ニデュランスおよびアスペルギルス・アワモリよりなる群から選ばれたものである請求項14に記載の真核細胞。

16、ラクtofエリンタンパク質をコードするポリデオキシリボヌクレオチドを有するプラスミドベクターを含む組換えプラスミドを含有する形質転換体真核細胞を、ラクtofエリンタンパク質が生成されるまで適当な栄養培地中で培養し、ついで該ヒトラクtofエリンを単離することを特徴とする。ラクtofエリンの製造方法。

17、(1) 遺伝子発現において制御的役割を有する1または複数の遺伝子要素、(2) ヒトラクtofエリンをコードするcDNA、および(3) 適当な転写および翻訳開始および停止配列の集合からなる転写単位を有する組換え発現ベクター。

18、該遺伝子要素がプロモーターである請求項17に記載のベクター。

19、該プロモーターがアルコールデヒドロゲナーゼ、argB、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよびbenAよりなる群から選ばれたものである請求項18に記載のベクター。

20、該転写停止配列が α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼおよびbenAよりなる群から選ばれたものである請求項17に記載のベクター。

21、請求項16に記載の方法によるタンパク質生成物。

【発明の詳細な説明】

組換えヒトラクトフェリンの製造発明の背景発明の技術分野

本発明は一般に鉄結合性糖タンパク質の分野に関する。さらに詳しくは、本発明はヒトラクトフェリンの組換え製造に関する。

関連技術の記載

ヒトラクトフェリン(LF)は、鉄結合性モノマー糖タンパク質のトランスフェリンファミリーの一員である。ヒトラクトフェリンは最初に乳中で発見され、初乳では7グラム/リットルのレベルまで達することがある。LFは以来、涙、唾液および粘膜分泌液などの他の外液中で検出されており、多形核白血球の二次顆粒中でも検出されている。

LFは、C末端半分とN末端半分とで高い相同性を有する2葉性構造を有する78kDaの糖タンパク質であり、該相同性はアミノ酸および3次元構造の両レベルで明らかである。これら各葉状構造は一つの鉄(III)イオンと高い親和性で可逆的に結合することができ、それと同時に重炭酸塩も結合する。ラクトフェリンに対して提唱されている生物学的機能としては、微生物感染に対する防御、幼児における腸内での鉄吸収の増進、細胞増殖の促進、骨髓造血の制御および炎症応答の修飾が挙げられる。

細胞外糖タンパク質の工業的生産において、糸状菌は宿主として首尾よく使用されている。ある種の工業的株は、これらタンパク質をグラム量で分泌することができる。加えて糸状菌は真核性タンパク質の翻訳後修飾を正確に行うことができ、多くの株は米国食品医薬品局の認可を得ている。さらに、大スケールの発酵技術および下流プロセッシング経験(downstream processing experience)を利用することができる。

現在のところ、ヒトLFを製造するための効率的かつ経済的な方法は存在しない。従って、栄養学的および治療学的適用さらに作用メカニズムのさらなる探求のためのヒトラクトフェリンの効率的製造方法の開発により、長い間の懸念であっ

た必要性と当該技術分野における記載が達成されるであろう。

発明の要約

一つの態様において、本発明は、ヒトラクトフェリンのcDNAを含む組換えプラスミドを提供する。本発明のプラスミドは、真核細胞中での発現用に適応されており、該真核細胞中でヒトラクトフェリンcDNAを発現するのに必要な制御要素を含む。

他の態様において、本発明は、組換えプラスミドを包含する形質転換した真核細胞を提供する。真核細胞は、アスペルギルス(Aspergillus)を含む一群の糸状菌から選択される。プラスミドは、ヒトラクトフェリンタンパク質をコードするポリデオキシリボヌクレオチド断片を挿入したプラスミドベクターを含む。

本発明のさらに他の態様において、組換えプラスミドを含む形質転換した真核細胞を培養することを包含する、組換えヒトラクトフェリンの製造法が提供される。プラスミドは、ヒトラクトフェリンタンパク質をコードするポリデオキシリボヌクレオチドを有するプラスミドベクターを含む。ヒトラクトフェリンタンパク質が生成されるまで適当な栄養培地中で培養した後、ヒトラクトフェリンタンパク質を単離する。

本発明のさらに別の態様において、組換え発現ベクターが提供される。このベクターは、(1)遺伝子発現における制御的役割を有する1または複数の遺伝子要素；(2)ヒトラクトフェリンをコードするcDNA；(3)適当な転写および翻訳開始および停止配列；および(4)該ベクターで形質転換されたアスペルギルス胞子の選択のための遺伝子要素の集合からなる転写単位を包含する。

本発明のさらに別の態様において、生物学的に活性な組換えラクトフェリンの製造方法が提供される。該方法は、選択マーカー遺伝子を含む配列、プロモーターを含む配列、転写停止配列、およびリンカー配列を合成し、これら配列をクローニングしてプラスミドを生成し、該プラスミドを制限エンドヌクレアーゼで消化し、ラクトフェリンをコードするcDNAを制限部位に挿入し、ついでラクトフェリンcDNAを発現するプラスミドで真核細胞を形質転換することからなる。

図面の簡単な記載

上記本発明の特徴、利点および目的並びにこれから明らかになるであろう他の特徴、利点および目的が得られさらに詳細に理解され得るように、上記で簡単に要約した発明の一層詳細な記載を、添付の図面で説明するある種の態様を参照しながら行う。これら図面は本明細書の一部を構成する。しかしながら、添付の図面は本発明の好ましい態様を説明するものであって、本発明の範囲を限定するものでないことに注意すべきである。本発明は、他の同様に有効な等価な態様を含む。

図1は、アスペルギルス・オリゼー (*aspergillus oryzae*) 発現プラスミド、pA.h1.f.gの模式図を示す。

図2は、形質転換したアスペルギルス・オリゼー株のサザンブロット分析を示す。

図3は、形質転換体とコントロールA07とのRNA分析を示す。

図4は、組換えLF分泌および精製の銀染色SDS-アクリルアミドゲル分析を示す。

図5は、ヒト組換えLFの特徴付けを示す。

図6は、ヒトラクトフェリンのcDNA配列を示す。

発明の詳細な記載

定義

本出願の目的のため、「トランスフェリンファミリー」なる語は、血清トランスフェリン、卵トランスフェリンおよびラクトフェリンを含む鉄輸送タンパク質のファミリーを意味する。これらタンパク質はすべて構造的に関連している。

本出願の目的のため、「ベクター」なる語は、ラクトフェリンcDNAの挿入、伝播および発現を可能とするプラスミドベヒクルを意味する。

本出願の目的のため、「宿主」なる語は、そのゲノム中にラクトフェリン発現プラスミドの組み込みを可能とするすべての真核細胞を意味する。

本出願の目的のため、「プロモーター」なる語は、ラクトフェリンcDNAの転写を制御する制御DNA配列を意味する。

本出願の目的のため、「マルチブルクローニングカセット」なる語は、種々の

cDNAの挿入を可能とする種々の酵素のための制限酵素開裂部位を含むDNA断片を意味する。

本出願の目的のため、「形質転換」なる語は、当該真核細胞によるプラスミドの取り込みを意味する。

本出願の目的のため、「鉄結合能」なる語は、 ^{56}Fe に結合する能力を意味する。完全に機能性のラクトフェリンは、1分子のLF当たり2原子の鉄と結合することができる。

本出願の目的のため、「生物学的活性／生物学的に活性」なる語は、鉄への結合能によって測定されるラクトフェリンの生物学的活性を意味する。ラクトフェリンタンパク質は鉄の輸送タンパク質として機能し、生物学的に活性であるためには鉄に結合する必要がある。

本明細書において引用する文献はすべて、参照のため本明細書に引用する。

以下に挙げる実施例は本発明の種々の態様を説明するためのものであり、いかなる形であれ本発明を限定することを意図するものではない。

実施例 1

真菌株および形質転換

これら研究において使用するpyrG変異株は、アスペルギルス・オリゼー(A07-11488)に由来するものであった。アスペルギルス・オリゼーからのpyrG遺伝子を4-ニトロキノリン-1-オキシドで変異させた。このアスペルギルスの形質転換は、オスマニ(Osmari)らの手順(J. Cell Biol. 104:1495~1504(1987))の修飾により行った。5 mMウラシルおよび10 mMウリジンを含有するYG培地(0.5%酵母エキス、2%グルコース)(50 ml)中に分生子(1×10^5 /ml)を接種した。菌の管状物が目に見えるようになるまで、32℃にて14~16時間増殖させた。発芽した分生子を遠心分離により回収し、0.4 M硫酸アンモニウム、50 mMクエン酸カリウム(pH 6.0)、0.5%酵母エキス、0.12 g ノボザイム(novozyme)、0.1 g ドリセラゼ(Driselase)、100 μ l β -グルクロニダーゼ、0.5%ショ糖および10 mM MgSO_4 を含有する溶解混合物(40 ml)中に再懸

濁した。32℃、150rpmにて2～3時間、プロトプラスト化を行った。プロトプラスト化の後、未消化の菌糸体を除去するために、滅菌ミラクロス(miracloth)を用いた濾過が必要であった。プロトプラストを遠心分離により回収し、10mlの0.4M硫酸アンモニウム、1%ショ糖および50mMクエン酸カリウム(pH6.0)で4℃にて2回洗浄し、1mlの0.6M KCl; 50mM CaCl₂; 10mMトリス-HCl(pH7.5)中に再懸濁し、氷上に置いた。プロトプラスト調製の直後に形質転換を行った。プロトプラストのアリコート(100μl)を、3μgのDNAおよび50μlの40%ポリエチレングリコール(PEG)6000、50mM CaCl₂、0.6M KClおよび10mMトリス-HCl(pH7.5)に加えた。試料を氷上で15分間インキュベートし、その後、PEG溶液をさらに1ml加え、室温でのインキュベーションを30分間続けた。この混合物のアリコートを、0.4%硫酸アンモニウムを添加した0.7%最小培地(3ml)中、同じ成分を含有するが2%アガーで固化したプレート上にプレーティングした。その後の増殖はすべて32℃で行った。

実施例2

プラスミドの構築

発現プラスミドの模式図を図1に示す。ヒトLFをコードする完全cDNAをDNAポリメラーゼIのクレノウ断片を用いて修復し、AccI消化し修復したpGEM4中にサブクローニングしてpGEMhLFcを得た。LFシグナル配列を除去しα-アミラーゼ配列とインフレームにある5'末端を生成させるため、pGEMhLFcプラスミドDNAの複製連鎖反応(PCR)増幅により、HindII/AccI末端を含有する252塩基対のラクトフェリン断片(69～321番目)を得た。使用したオリゴプライマーは以下の通りであった。SEQ ID NO1に示す5'末端オリゴヌクレオチド:

(CTGGGTCGACGTAGGAGAAGGAGTCTTCAGTGGTGC)

およびSEQ ID NO2に示す3'末端オリゴヌクレオチド:

(GCCGTAGACTTCGCCGCTACAGG)

このPCR断片をHindIIおよびAccIで消化し、HindII/AccI

消化した pGEMhLFC 中にサブクローニングして pGEMhLF を生成した。プロモーター、シグナル配列および成熟 α -アミラーゼ II 遺伝子の開始部からのアラニン残基をコードする Asp 718/PvuII 末端を有する 681 塩基対の α -アミラーゼ断片を、アスペルギルス・オリゼーのゲノム DNA の PCR 増幅により得た。オリゴプライマーは以下の通りであった。SEQ ID NO 3 に示す 5' 末端オリゴヌクレオチド：

(GAGGTACCGAATTCATGGTGTGTTTGGATCATTTTAAATTTTAT)

および SEQ ID NO 4 に示す 3' 末端オリゴヌクレオチド：

(AGCAGCTGCAGCCAAAGCAGGTGCCGCGACCTGAAGGCCGTACAG)

増幅した DNA を Asp 718 および PvuII で消化し、Asp 718/Hind11 消化した pGEMhLFC 中にサブクローニングした。得られたプラスミド (pGEMhLF) を EcoRI で消化し、得られた 2.8 kb α -アミラーゼ-ラクトフェリン断片を、pAhLF* を生成するための方法に従って pAL3 中の唯一の EcoRI 部位にサブクローニングした。pAhLF* で失われたラクトフェリンの最後の 5 つのカルボキシ末端コドン (2138~2153 番目) を提供するため、およびアスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ遺伝子からの 3' 非翻訳配列の最初の 180 塩基対を提供するため、合成オリゴヌクレオチドを用いた。得られたプラスミド (pAhLFG) を用いてアスペルギルス・オリゼー pyrG 変異株を形質転換させた。

図 1 を参照すると、アスペルギルス・オリゼー発現プラスミド pAhLFG は、アスペルギルス・オリゼー AMY11 遺伝子の 5' フランキング配列の 681 塩基対 (シグナル配列および成熟 α -アミラーゼの最初のコドンを含む) を含む。これら配列から下流にインフレームで成熟ヒトラクトフェリンをコードする cDNA をサブクローニングして、増殖培地にデンプンを添加することによって組換えタンパク質の産生を可能にする。アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ 3' 非翻訳領域は、転写ターミネーターおよびポリアデニル化シグナルを提供する。このプラスミドはまた、ニューロスポラ・クラッサ (Neurospora crassa) pyr4 選択マーカーおよびアンピシリン耐性遺伝子をも含有する。

ヒトLFの発現に用いるプラスミド構築物 (pA h L F G) は、アスペルギルス・オリゼー α -アミラーゼII遺伝子 (AMY11) のプロモーターおよび分泌シグナルペプチドをコードする681塩基対断片を含有する。シグナル配列はまた、 α -アミラーゼ成熟タンパク質の開始部からのアラニンのコドンを含み、エンドゲナーゼである α -アミラーゼペプチダーゼにより認識され得るシグナル配列開裂部位 (Leu Ala Ala) を生成する。成熟タンパク質をコードするヒトラクトフェリン cDNA断片をAMY11配列のすぐ下流にインフレームでサブクロニングし、この高度に効率的なデンプン誘導性プロモーターの制御下に置いた。転写されたヒトLF mRNAを安定化させるため、アスペルギルス・ニガーからのグルコアミラーゼ遺伝子の3'非翻訳領域をコードする180塩基対断片を、ヒトLF cDNAのすぐ下流のマルチブルクロニングカセット中の唯一のBamHI部位中にライゲートして、転写ターミネーターおよびポリアダニル化シグナルを提供した。このプラスミドにはまた、アスペルギルス・オリゼーのpyrG栄養要求性変異を補償するニューロスボラ・クラッサPyr4選択マーカーも含まれ、ウリジンの不在下で増殖させることによってプラスミドで形質転換された胞子の選択を可能としている。

実施例3

ゲノムDNAの操作

アスペルギルス・オリゼーのDNAの単離は、ラフムッセン (Rafmussen) らのJ. Biol. Chem., 265:13767~13775 (1990) に記載された方法に従い、凍結乾燥した菌糸体 (200mg) から行った。このDNAをEcoRIで消化し、0.8%アガロースゲル上でサイズ分画し、ニトロセルロースに移した。サザーン分析のためのニトロセルロースフィルターのプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを、6×SSC、0.1%SDSおよび0.5%粉乳中、65℃で16時間行った。ハイブリダイゼーション溶液には 1×10^7 cpmの 32 P-標識ラクトフェリン cDNAプローブ (2.1Kb) が含まれていた。フィルターを2×SSC、0.5%SDS中、室温にて30分間洗浄し、ついで0.5×SSC、0.5%SDS中、68℃で30分間、

2回洗浄した。フィルターを乾燥させ、 -70°C で2時間感光させ、オートラジオグラフィーにより現像した。

図2を参照すると、形質転換したアスペルギルス・オリゼー株に対してサザンブロット分析を行った。個々の形質転換体およびコントロールA O 7からのゲノムDNAを放射性標識h L F c DNAプローブ(2.1 kb)とハイブリダイズさせた。矢印は、発現プラスミドのE c o R I消化によって生成する放射性標識断片(2.8 kb)を示し、これはすべての形質転換体(#1~9)には存在するがコントロールの非形質転換A O 7には存在しない。バクテリオファージラムダH i n d I I I断片の分子量を左側に示す。

実施例4

ノーザン分析

市販のRNazolB(ビオキシテック・ラボトリーズ、ヒューストン、テキサス州)を用い、製造業者の指示に従ってRNAを凍結乾燥菌糸体(200 mg)から単離した。2.2 Mホルムアルデヒドを含有する0.8%アガロースゲル中で全RNA(20 μg)を電気泳動にかけた。RNAをニトロセルロースに移し、2.1 kbのラクトフェリンc DNAかまたは α -アミラーゼ11遺伝子のコード領域に対応する1.8 kbのゲノム α -アミラーゼ断片のいずれかとハイブリダイズさせた。プローブをニックトランスレーションにより ^{32}P -標識した(比活性 $>2 \times 10^8 \text{ c p m} / \mu\text{g}$)。ハイブリダイゼーションを、 $2 \times \text{SSC}$ 、0.05%粉乳中、 65°C にて氷上、 $2 \times 10^5 \text{ c p m} / \text{ml}$ で行った。

洗浄はサザン分析に用いたものと同じであった。フィルターを乾燥させ、 -70°C にて2時間感光させ、オートラジオグラフィーにより現像した。ニトロセルロース膜およびマニホルド(manifold)ドットシステムを用いてRNAドットブロッティングを行った。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件はサザン分析に記載したものと同様であった。放射能をベタゴン(beta-gon)プロットアナライザーを用いて定量した。

ラクトフェリタンパク質の組換え産生をその好ましい態様において記載した。しかしながら、サッカロミセス・セレビシエ(saccharomyces cerevisiae)やビ

キア・パストルシス (*pichia pastoris*) などの真菌源または S F 9 などの昆虫細胞などの他の多くの採取源で産生させることも可能である。

図3において、RNA分析を形質転換体とコントロールA O 7を比較して行った。パネルAでは、コントロールA O 7および形質転換体#1からのRNA (20 μ g) を放射性標識ヒトL F γ cDNAとハイブリダイズさせたノーザン分析を示す。ヒトL F γ mRNA (2.3 kb) が形質転換体#1では検出されたが、コントロールの非形質転換A O 7では検出されなかった。28 s および 18 s rRNAバンドの位置を左側に示す。パネルBでは、放射性標識 α -アミラーゼゲノムDNAプローブを用いた、コントロールA O 7および形質転換体#1からのRNA (5および10 μ g) のドットプロットを比較して示す。パネルCでは、放射性標識ヒトL F γ cDNAプローブを用いた、コントロールA O 7および形質転換体#1からのRNA (5および10 μ g) のドットプロットを比較して示す。

本発明の発現プラスミドの制御要素下でラクトフェリンmRNAがアスペルギルス・オリゼー中で正確かつ効率的に転写されるか否かを決定するためにノーザン分析を行った。形質転換体#1からの胞子 (1×10^6 / ml) およびコントロールの非形質転換胞子を、炭素源として1.5%グルコースを含有する真菌培地中に接種し、小さなシェークフラスコ培地中、30℃にて48時間増殖させた。培養液を洗浄し、3%ゲンブンを含有する真菌培地中に再接種してヒトL F γ mRNAの転写を誘導した。24時間後、細胞を回収し、RNAを単離した。2.2Mホルムアルデヒドを含有する1.0%アガロースゲル上で全RNA (20 μ g) をサイズ分画し、ニトロセルロース上にブロッティングした。

ヒトラクトフェリンmRNAの検出は 32 P標識したヒトL F γ cDNA (2.3 kb) プローブを用いて行った。ヒトL F 放射性標識cDNAプローブとのハイブリダイゼーションは、形質転換体においてラクトフェリンmRNAに対する正確なサイズにて (2.3 kb) 特定の放射性標識バンドを検出したが、コントロールの非形質転換体では検出されなかった (図3A)。ドットアッセイによるmRNAレベルの定量は、コントロールのA O 7と形質転換体#1との間で匹敵

し得るレベルの内生 α -アミラーゼrRNAの発現を示した(図3B)。加えて、形質転換体#1では α -アミラーゼとヒトLF mRNAとで同様のレベルの発現が認められた(図3Bおよび3C)。

実施例 5

ヒト組換えLFの精製

増殖培地からのLFの精製は、実質的にストウェル(Stowell)らのBiochem. J., 276:349~59(1991)の記載に従い、CMセファデックスC50を用いて行った。カラムを500mlの0.025MトリスHCl(pH7.5)、0.1M NaClで前以て平衡化した。該前以て平衡化したカラムに適用する前に培地のpHをpH7.4に調節した。カラムを平衡緩衝液(500ml)で洗浄し、ついで0.1~1.1M NaClの直線塩勾配により洗浄した。SDS/PAGEおよび銀染色を用い、フラクション(全部で7ml)をラクトフェリン含量および純度についてアッセイした。LFを含有するフラクションを0.025M トリスHCl、pH7.5/0.1 M NaClに対して透析し、凍結乾燥させた。

実施例 6

ヒトLFの定量

本質的にビルジャ(Vilja)らのJ. Immunol. Methods, 76:73~83(1985)の記載に従い、ELISAアッセイを用いて組換えラクトフェリンを定量した。非競合アビジン-ビオチンアッセイを用いて5ngのラクトフェリン感度を得られた。乳房乳から単離したヒトLF(シグマ)を標準として用いた。ビオチン化したヒトラクトフェリンIgGはジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ(Jackson ImmunoResearch Laboratories)、ウエストグロブ、ペンシルベニア州から得た。

実施例 7

N末端の配列決定

製造業者の指示に従い(アプライド・バイオシステムズ)、精製ヒト組換えLF(5 μ g)をSDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離させ、プロブロット

(Problott) (ポリビニリデンジフルオライド型の膜)に移した。ヒトLFをクマシーブリリアントブルー染色で検出し、脱染色した。このヒトLFのバンドを切り出し、蒸留H₂Oで十分に洗浄し、空気乾燥させた。ヒトLFの最初の10アミノ酸のN末端アミノ酸配列を、アプライド・バイオシステムズのパルス (Pulsed) ー液相シーケンサー (モデル477A) を用いて自動エドマン分解法により決定した。

図4を参照すると、パネルAは、組換えヒトLF分泌および精製の銀染色SDS-ポリアクリルアミドゲル分析を示す。レーン1には乳房乳ヒトLF標準 (500 ng) が含まれる。レーン2および3には、それぞれ誘導コントロールAO7および形質転換体#1からの増殖培地の試料 (40 μ g) が含まれる。レーン4~8には、形質転換体#1の増殖培地からの組換えLFのCM-セファデックス精製により回収した溶出フラクション (それぞれ、#25、30、35、40および45) の100 μ lアリコートが含まれる。分子量マーカー (バイオラッド・ラボラトリーズ、リッチモンド、カリフォルニア州) の位置を左側に示す。サイズはキロダルトンにて示す。パネルBは、ヒトLFに対して向けられた特異的ポリクローナル抗体を用い¹²⁵I-アプロテインAで検出する、パネルAの記載と同じ2つの試料のウエスタンイムノブロット分析を示す。パネルCは、組換えヒトLFの#6 N末端アミノ酸配列を示す。組換えヒトLFをN末端から10の残基で配列決定したが、本発明の構築物においてアラニンが付加されて α -アミラーゼシグナル配列開裂部位を提供すること以外は乳房乳ヒトLFと同一である。

実施例 8

脱糖付加

N-グリコシダーゼF (ペーリンガー・マンハイム) を用いて脱糖付加を行った。ラクトフェリン (0.5 μ g) を含有するアスペルギルス・オリゼーの増殖培地を0.01% SDSの存在下、100℃にて3分間変性させた。ヒト乳からの標準LFも同様に処理した。その後、試料を氷上に5分間置いた。N-グリコシダーゼF反応を0.4Mリン酸ナトリウム (pH 6.8) ; 0.08% トリトン ; 0.1% β -メルカプトエタノールおよび1単位酵素中で行い、37℃で16時

間インキュベートした。ヒトラクトフェリンに対して特異的に向けられたIgGを用いてPAGEおよびウエスタン分析を行い、消化した試料の移動度の増加を検出した。

図5にヒト組換えLFの特徴付けを行った。パネルAはラクトフェリンの脱糖付加を示す。パネルAはラクトフェリンの脱糖付加を示す。ヒトラクトフェリンに対して向けられた特異的なポリクローナル抗体を用いて糖付加したラクトフェリンおよび脱糖付加したラクトフェリンのウエスタン分析を行い、検出は¹²⁵I-アブプロテインAで行った。第一のパネルには、NグリコシダーゼFで処理していない(-)および処理した(+)¹初乳ヒトLF(500 ng)が含まれる。第二のパネルには、NグリコシダーゼFで処理していない(-)および処理した(+)²精製組換えヒトLF(500 ng)が含まれる。糖付加したヒトLFのサイズを矢印で示す。パネルBは、鉄結合能に関する組換えラクトフェリンの機能分析を示す。パネルAおよびBは、それぞれ、示した濃度における初乳ヒトLFおよび精製組換えヒトLFの2つの試料の⁵⁶Feフィルター結合アッセイを示す。両パネルにおける第一のレーンには、陰性コントロールとしてBSA(5 μg)が含まれる。

ラクトフェリンは、N-グリコシド結合により結合した2つのN-アセチルラクトアミン型のグリカンを含む。組換えラクトフェリンが正確に糖付加されるかどうかを決定するため、該タンパク質をN-グリコシダーゼFで処理し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動上で分離し、ニトロセルロースに移し、ヒトラクトフェリンに対して向けられた特異的IgGを用いてプローブした(図5A)。N-グリコシダーゼFはグリコシルアミン結合において加水分解して、分子量の小さい炭水化物不含のペプチドを生成する。組換えLFをヒト乳から精製したLFと比較すると、N-グリコシダーゼF消化によって両タンパク質とも一緒に移動し、該組換えタンパク質が天然LFと同じ糖付加パターンを有することが示唆された。

ラクトフェリンは、各葉状部が一つのFe³⁺イオンと堅固だが可逆的に結合する能力を有する2葉性構造を有する。ラクトフェリンの鉄結合特性は、その機能

的役割にとって非常に重要である。アスベルギルス・オリゼーで発現され分泌された組換えヒトLFが初乳ラクトフェリンと同様の鉄結合能を有するかどうかを試験するため、 ^{56}Fe マイクロフィルター結合アッセイを開発した。形質転換体#1の増殖培地から単離した精製ヒトラクトフェリンを0.1Mクエン酸(pH2.0)に対して透析してアポーヒトLFを生成した。ヒト乳からの天然ラクトフェリンも同様に処理した。等容量の1M重炭酸塩中のこれら試料に過剰の ^{56}Fe (0.2mCi)を加え、ついで37℃にて30分間インキュベートした。試料をニトロセルロース膜に適用し、重炭酸塩で数回洗浄した。オートラジオグラフィによりフィルターを視覚化し、ベタゴンプロットアナライザーを用いてFe-結合を定量した。図5Bに示すように、試験したすべての濃度において組換えLFおよび天然LFの両方とも同様の鉄結合レベルを示した。これら結果は、鉄結合能において組換えヒトLFが天然ヒトLFと識別できないことを示している。

図6において、ヒトラクトフェリンタンパク質の全cDNA配列を示す。ラクトフェリンをコードするcDNAは、プラスミドを生成し、真核細胞を形質転換し、ラクトフェリンタンパク質を製造するために用いる。

本発明において使用するアスベルギルスの株は、欠損 $pyr4$ 遺伝子を含むためオロチジン5'-リン酸(OMP)デカルボキシラーゼを合成することができない栄養要求変異株である。この酵素は、ウリジンの合成に必要である。この株はウリジンを欠く培地で増殖できない。このプラスミドは、選択マーカー、すなわちOMPデカルボキシラーゼの遺伝子をコードする配列を含む。それゆえ、アスベルギルスによる該プラスミドの取り込みは、ウリジンを欠く培地上で増殖させることによって選択することができる。アスベルギルスは、ウリジン欠失培地上で増殖できるように該プラスミドにより形質転換される。

本発明の一つの態様において、生物学的に活性な組換えラクトフェリンタンパク質が製造される。この方法は、選択マーカー遺伝子を含む配列、プロモーターを含む配列、転写停止配列およびリンカー配列を合成することを包含する。その後、これら配列をクローニングしてプラスミドを生成させ、該プラスミドを制限エンドヌクレアーゼで消化する。ラクトフェリンをコードするcDNAを制限部

位に挿入し、ついで真核細胞をラクトフェリンcDNAを発現する該プラスミドで形質転換する。

本発明の方法に使用する選択マーカー遺伝子は、ラクトフェリンcDNAプラスミドで形質転換された細胞の単離を可能とするものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、選択マーカー遺伝子は、*pyr4*、*pyrG*、*argB*、*trpC*および*andS*から選ばれる。

本発明において有用なプロモーターは、ラクトフェリンcDNAの転写を制御することができるものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、プロモーターはアルコールデヒドロゲナーゼ、*argB*、 α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼよりなる群から選ばれる。

本発明において有用な転写停止配列は、ラクトフェリンmRNAの安定化を可能とするものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、転写停止配列は α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼまたは*benA*に由来するものである。

本発明において有用なリンカー配列は、翻訳開始コドン、分泌シグナルおよび制限酵素開裂部位を含むものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、リンカー要素は α -アミラーゼ、グルコアミラーゼまたはラクトフェリンに由来するものである。

本発明において有用な真核細胞は、ラクトフェリンcDNAを含むプラスミドを組み込むことができ、ラクトフェリンcDNAを発現することができるものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、真核細胞は真菌細胞または昆虫細胞である。SF9などの昆虫細胞が本発明の方法に有用である。さらに好ましくは、真菌細胞は酵母細胞である。最も好ましくは、本発明において有用な真核細胞は、アスペルギルス・オリゼー、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ニデウランス (*A. nidulans*) およびアスペルギルス・アワモリ (*A. awamori*) などのアスペルギルス株である。

本明細書には本発明の目的を達成するための具体例について開示しているが、本発明の精神および範囲を逸脱しない範囲において方法および装置を若干改変し

てもよい。またクレームに記載の各要素および工程は実質的に同じまたは均等の結果をもたらすようなすべての要素および工程を含むものである。また本発明は、その原理を利用する限りにおいていかなる態様も広く包含する。したがって、本発明は、その目的を達成し、開示の目的物および利点ならびに潜在的な他のすべてのものを達成するために適合されるものである。

【図1】

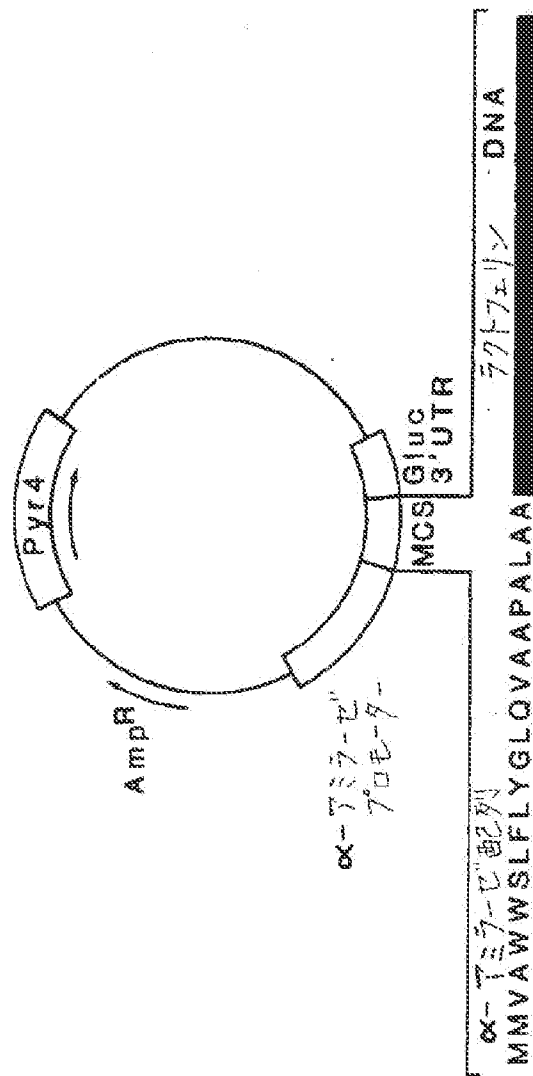


FIG. 1

【図2】

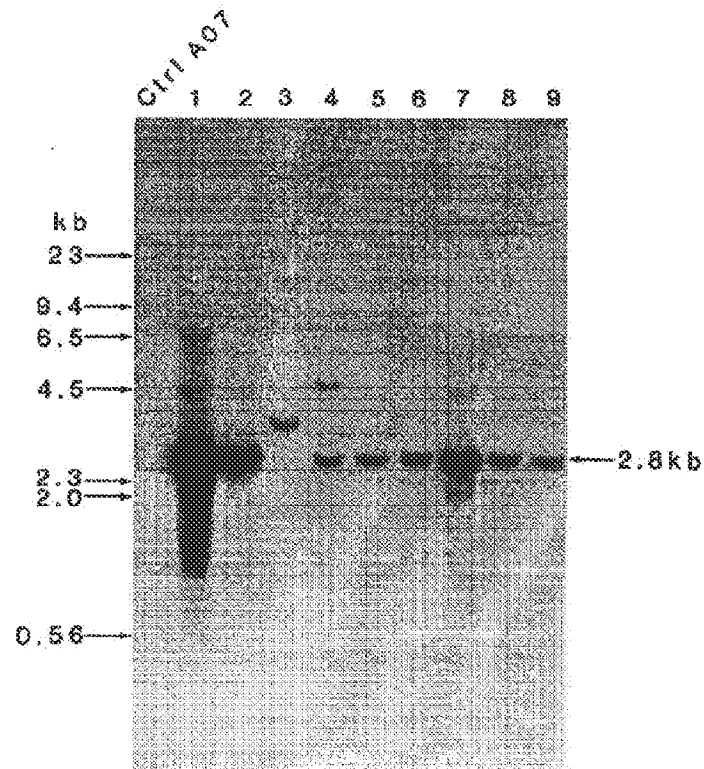


FIG. 2

【図3A】



FIG. 3A

【図3B】

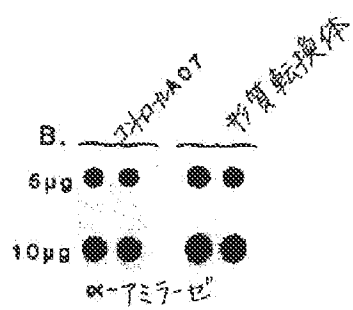


FIG. 3B

【図3C】

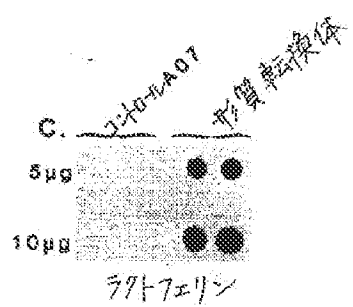
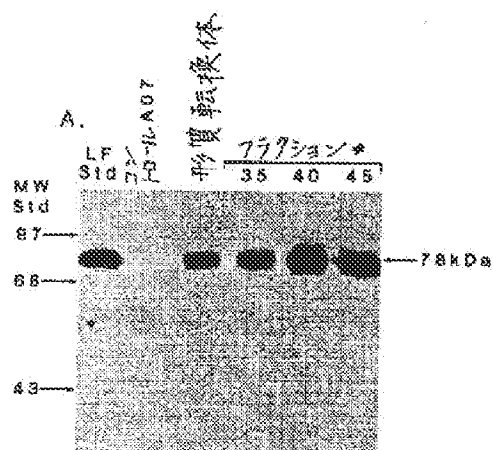


FIG. 3C

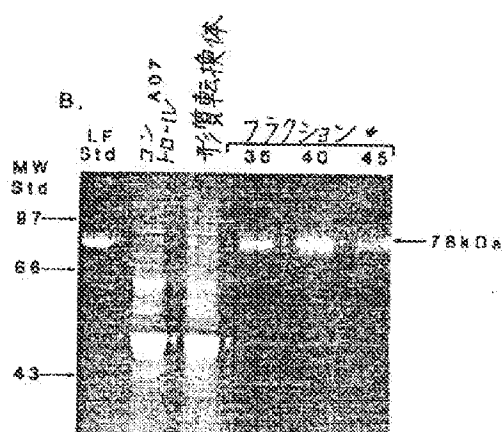
[X 4 A]

FIG. 4A



[4 B]

FIG. 4B



【図4C】

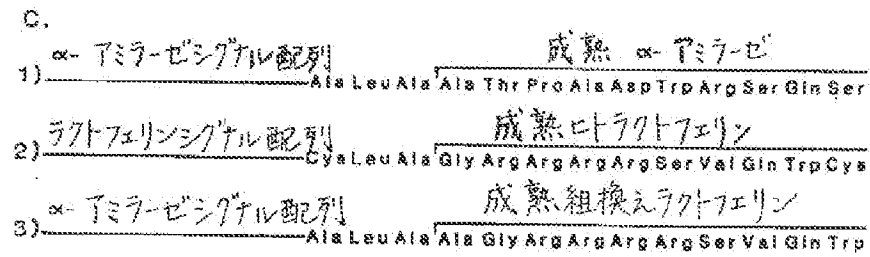
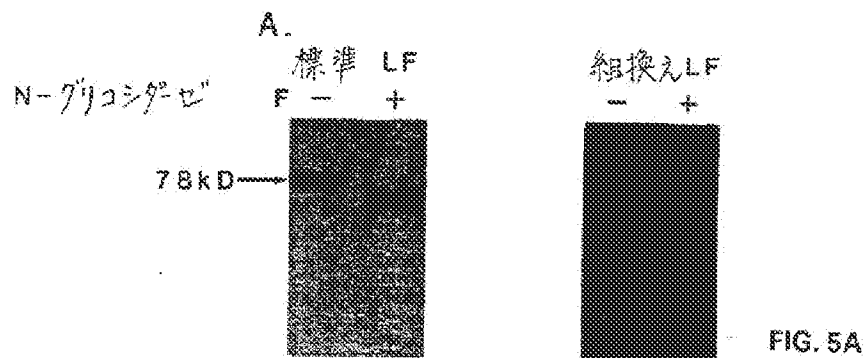
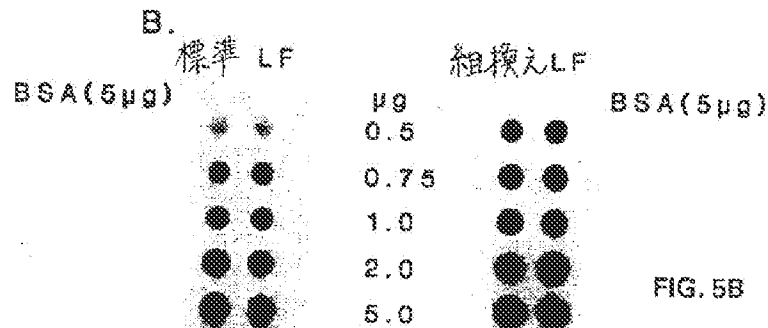


FIG. 4C

【図5A】



【図5B】



【图6】

cDNA SEQUENCE AND AMINO ACID SEQUENCE
OF HUMAN LACTOFERRIN

```

1
GAATTCC CACCGCAGAC
18
ATC AAA CTT CTC TTC CTC CTC CTG CTG TTC CTC GGG GCG CTC GGA CTC
met lys leu val phe leu val leu leu phe leu gly ala leu gly leu
1
66
TGT CTG CCT GCG CCG AGG ACA AGG AGT GTT CAG TGG TGC ACC GTA TCC
cys leu ala gly arg arg arg arg ser val gln trp cys thr val ser
17
114
CAA CCG GAG GCC ACA AAA TGC TTC CAA TGG CAA AGG AAT ATC AGA AGA
gln pro glu ala thr lys cys phe gln trp gln arg asn met arg arg
33
162
GTG CGT GCG CCT CCG CTC AGC TGC ATA AAG AGA GAC TCC CCC ATC CAG
val arg gly pro pro val ser cys ile lys arg asp ser pro ile gln
49
210
TGT ATC CAG GCC ATT GCG GAA AAC AGG GCG GAT GCT GTG ACC CTT GAT
cys ile gln ala ile ala glu asn arg ala asp ala val thr leu asp
65
258
GCT CCG TTC ATA TAC GAG GCA GCG CTC GCG CCC TAC AAA CTG CGA CCT
gly gly phe ile tyr glu ala gly leu ala pro tyr lys leu arg pro
81
306
GTA CCG CCG GAA CTC TAC GCG ACC GAA AGA CAG CCA CGA ACT CAC TAT
val ala ala glu val tyr gly thr glu arg gln pro arg thr his tyr
97
354
TAT CCG GTG GCT GTG GTG AAG AAG GCG GCG AGC TTT CAG CTG AAC GAA
tyr ala val ala val val lys lys gly gly ser phe gln leu asn glu
113
402
CTG CAA GGT CTG AAG TCC TGC CAC ACA GCG CTT CCG AGG ACC GCT GGA
leu gln gly leu lys ser cys his thr gly leu arg arg thr ala gly
129
450
TGG AAT GTG CCT ATA GCG ACA CTT CCG CCA TTC TTG AAT TGG ACG GGT
trp asn val pro ile gly thr leu arg pro phe leu asn trp thr gly
145

```

Sheet 1 of 4

FIGURE 6

【 図 6 】

498
 CCA CCT GAG CCC ATT GAG GCA GCT GTG GCC AGG TTC TTC TCA GCC ACC
 pro pro glu pro ile glu ala ala val ala arg phe phe ser ala ser
 161

546
 TGT GTT CCC GCT GCA GAT AAA GGA CAG TTC CCC AAC CTG TGT CGC CTG
 cys val pro gly ala asp lys gly gln phe pro asn leu cys arg leu
 177

594
 TGT GCG GGG ACA GGG GAA AAC AAA TGT GCC TTC TCC TCC CAG GAA CCG
 cys ala gly thr gly glu asn lys cys ala phe ser ser gln glu pro
 193

642
 TAC TTC AGC TAC TCT GGT GCC TTC AAG TGT CTG AGA GAC GCG GCT GGA
 tyr phe ser tyr ser gly ala phe lys cys leu arg asp gly ala gly
 209

690
 GAC GTG GCT TTT ATC AGA GAG AGC ACA GTG TTT GAG GAC CTG TCA GAC
 asp val ala phe ile arg glu ser thr val phe glu asp leu ser asp
 225

738
 GAG GCT GAA AGG GAC GAG TAT GAG TTA CTC TGC CCA GAC AAC ACT CCG
 glu ala glu arg asp glu tyr glu leu leu cys pro asp asn thr arg
 241

786
 AAG CCA GTG GAC AAG TTC AAA GAC TGC CAT CTG GCC CGG GTC GCT TCT
 lys pro val asp lys phe lys asp cys his leu ala arg val pro ser
 257

834
 CAT GCC GTT GTG GCA CGA AGT GTG AAT GGC AAG GAG GAT GCC ATC TGG
 his ala val val ala arg ser val asn gly lys glu asp ala ile trp
 273

882
 AAT CTT CTC CGC CAG GCA CAG GAA AAG TTT GGA AAG GAC AAG TCA CCG
 asn leu leu arg gln ala gln gln lys phe gly lys asp lys ser pro
 289

930
 AAA TTC CAG CTC TTT GGC TCC CCT AGT GGG CAG AAA GAT CTC CTC TTC
 lys phe gln leu phe gly ser pro ser gly gln lys asp leu leu phe
 305

978
 AAG GAC TCT GCC ATT GCG TTT TCG AGG GTG CCC CCG AGG ATA GAT TCT
 lys asp ser ala ile gly phe ser arg val pro pro arg ile asp ser
 321

1026
 GCG CTG TAC CTT GGC TCC GGC TAC TTC ACT GCC ATC CAG AAC TTC AGC
 gly leu tyr leu gly ser gly tyr phe thr ala ile gln asn leu arg
 337

【図6】

1074

AAA AGT GAG GAG GAA GTG CCT GCC CGG CCT GCG CGG GTC GTG TCG TCT
lys ser glu glu glu val ala ala arg arg ala arg val val trp cys
353

1122

GCG GTG GGC GAG CAG GAG CTG CGC AAG TGT AAC CAG TCG ACT CGC TTC
ala val gly glu gln glu leu arg lys cys asn gln trp ser gly leu
369

1170

AGC GAA GGC AGC GTG ACC TGC TCC TCG GCC TCC ACC ACA GAG CAC TCC
ser glu gly ser val thr cys ser ser ala ser thr thr glu asp cys
385

1218

ATC GCC CTG CTG CTG AAA GCA GAA GCT GAT CCC ATG AGT TTG GAT GGA
ile ala leu val leu lys gly glu ala asp ala met ser leu asp gly
401

1266

GCA TAT GTG TAC ACT GCA GGC AAA TGT GGT TTG GTG CCT CTC CTG GCA
gly tyr val tyr thr ala gly lys cys gly leu val pro val leu ala
417

1314

GAG AAC TAC AAA TCC CAA CAA AGC AGT GAC CCT GAT CCT AAC TGT GTG
glu asn tyr lys ser gln gln ser ser asp pro asp pro asn cys val
433

1362

GAT AGA CCT GTG GAA GCA TAT CTT GCT GTG GCG GTG GTT AGG AGA TCA
asp arg pro val glu gly tyr leu ala val ala val val arg arg ser
449

1410

GAC ACT AGC CTT ACC TGG AAC TCT GTG AAA GGC AAG AAG TCC TGC CAC
asp thr ser leu thr trp asn ser val lys gly lys lys ser cys his
465

1458

ACC GCC GTG GAC AGG ACT GCA GGC TGG AAT ATC CCC ATG GGC CTG CTC
thr ala val asp arg thr ala gly trp asn ile pro met gly leu leu
481

1506

TTC AAC CAG ACG GGC TCC TCC AAA TTT GAT GAA IAT TTC AGT CAA AGC
phe asn gln thr gly ser cys lys phe asp glu tyr phe ser gln ser
497

1554

TGT GCC CCT GCG TCT GAC CCG AGA TCT AAT CTC TGT GCT CTG TGT ATT
cys ala pro gly ser asp pro arg ser asn leu cys ala leu cys ile
513

1602

GCG GAC GAG CAG GGT GAG AAT AAG TGC GTG CCC AAC AGC AAT GAG AGA
gly asp glu gln gly glu asn lys cys val pro asn ser asn glu arg
529

【図6】

1650

TAC TAC GGC TAC ACT GGC GCT TTC CCG TGC CTG GCT GAG AAT GCT GCA
 tyr tyr gly tyr thr gly ala phe arg cys leu ala glu asn ala gly
 545

1698

GAC GTT GCA TTT GTG AAA GAT GTC ACT GTC TTG CAG AAC ACT GAT GGA
 asp val ala phe val lys asp val thr val leu gln asn thr asp gly
 561

1746

AAT AAC AAT GAG GCA TGG GCT AAG GAT TTG AAG CTG GCA GAC TTT GCG
 asn asn asn glu ala trp ala lys asp leu lys leu ala asp phe ala
 577

1794

CTE CTG TGC CTC GAT GGC AAA CCG AAG CCT GTG ACT GAG GCT AGA ACC
 leu leu cys leu asp gly lys arg lys pro val thr glu ala arg ser
 593

1842

TSC CAT CTT GCC ATG GCC CCG AAT CAT GCC GTG GTG TCT CCG ATG GAT
 cys his leu ala met ala pro asn his ala val val ser arg met asp
 609

1890

AAG GTG GAA CGC CTG AAA CAG GTG CTG CTC CAC CAA CAG GCT AAA TTT
 lys val glu arg leu lys gln val leu leu his gln gln ala lys phe
 625

1938

GGC AGA AAT GGA TCT GAC TGC CCG GAC AAG TTT TGC TTA TTC CAG TCT
 gly arg asn gly ser asp cys pro asp lys phe cys leu phe gln ser
 641

1986

GAA ACC AAA AAC CTT CTG TTC AAT GAC AAC ACT GAG TGT CTG GCC AGA
 glu thr lys asn leu leu phe asn asp asn thr glu cys leu ala arg
 657

2034

CTC CAT GCC AAA ACA ACA TAT GAA AAA TAT TTG GCA CCA CAG TAT GTC
 leu his gly lys thr thr tyr glu lys tyr leu gly pro gln tyr val
 673

2082

GCA GGC ATT ACT AAT CTG AAA AAG TGC TCA ACC TCC CCC CTC CTG GAA
 ala gly ile thr asn leu lys lys cys ser thr ser pro leu leu glu
 689

2130

GCC TGT GAA TTC CTC AGC AAG TAA
 ala cys glu phe leu arg lys *** ACCGAA GAAGATGCCC CAGCTCCCCA
 705

2180

AGAAAGCCTC ACCCATTCAC TGCCCCCAGC TCTTCTCCCC AGGTGIGTTC GGGCCTTGGC

2240

TCCCCTGCTG AAGGTGGGGA TTGCCCATCC ATCTGCTTAC AATTCCTGTC TGTCGTCTTA

2300

GCAAGAAGTA AAATGAGAAA TTTTGTTCGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/03614

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(S) : C07K 15/06, 15/14; C12N 15/04, 15/06, 15/10, 15/12 US CL : 536/23.5; 530/350, 394; 435/69.1, 240.2, 254, 255, 320.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/23.5; 530/350, 394; 435/69.1, 240.2, 254, 255, 320.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, DIALOG, Swissprot, PIR, search terms: lactoferrin, amylase, oryzae, aspergillus, cDNA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Biochemical Journal, Volume 276, issued June 1991, Stowell et al., "Expression of cloned human lactoferrin in baby-hamster kidney cells", pages 349-355, see especially p. 350, column 2.	1,3,4,8,10,11,13, 16-18,21 1-21
Y	WO, A, 89/01969 (Woldike, H.F.) 09 March 1989, see whole publication, especially pages 3, 5, 6, 10 and 11.	1-21
Y	Gene, Volume 79, issued 1989, Gines et al., "Aspergillus oryzae has two nearly identical Taka-amylase genes, each containing eight introns", pages 107-117, see especially the abstract and Figures 2 and 3.	1-21
Y	Journal of Molecular Biology, Volume 173, issued 1984, G. von Heijne, "How signal sequences maintain cleavage specificity", pages 243-251, see especially page 244.	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" documents which may throw doubt on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 May 1993		27 JUL 1993
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231		Authorized officer KEITH C. FURMAN, PH.D.
Facsimile No. NOT APPLICABLE		Telephone No. (703) 308-0198

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/03614

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Nucleic Acids Research, Volume 18, Number 13, issued 1990, Powell et al., "Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA", page 4013.	1-21
Y	Lipids, Volume 24, Number 9, issued 1989, Høge-Jensen et al., " <u>Rhizomucor miehei</u> triglyceride lipase is processed and secreted from transformed <u>Aspergillus oryzae</u> ", pages 781-785, see especially the abstract.	1-21
Y	US, A, 4,740,461 (Kaufman) 26 April 1988, see whole patent, especially Table 1 and columns 11 and 12.	1-21
Y,P	US, A, 5,155,037 (Summers) 13 October 1992, filed 04 August 1989, see whole patent, especially columns 1 and 4-8.	1, 3, 8, 10, 11, 12, 16-18, 21

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶ 識別記号 庁内整理番号 FI

C12N 5/10

15/09

//C12N 1/19

C12R 1:66)

(C12N 5/10

C12R 1:91)

//C12N 5/00

A

C12R 1:91)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AT, AU, BB, BG, B R, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB , HU, JP, KP, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, S E, SK

(72)発明者 オマリー、バート・ダブリュー
アメリカ合衆国77079テキサス、ヒュース
トン、ランブルウッド639番

(72)発明者 メイ、グレゴリー・エス
アメリカ合衆国77025テキサス、ヒュース
トン、ダーネス4119番